*Laboratorio di Clinica Medica della R. Università di Napoli,*
*diretto dal prof. E. DE RENZI*

# RICERCHE
# sulle sostanze battericide del siero di sangue del coniglio



PEL

Dottor NICOLA PANE

(*Estratto dalla Rivista Clinica e Terapeutica, Anno XIV, N. 12, 1892*).

NAPOLI
CAV. GIOVANNI JOVENE, EDITORE
*Strada Cisterna dell'Olio, n. 10 p.º p.º*
1892.

*Laboratorio di Clinica Medica della R. Università di Napoli,*
*diretto dal prof. E. DE RENZI*

---

# RICERCHE

# sulle sostanze battericide del siero di sangue del coniglio

PEL

**Dottor NICOLA PANE**

---

(*Estratto dalla Rivista Clinica e Terapeutica, Anno XIV, N. 12, 1892*).

NAPOLI
CAV. GIOVANNI JOVENE, EDITORE
*Strada Cisterna dell'Olio, n. 10 p.° p.°*
1892.

Nella mia comunicazione fatta l'anno scorso (1891) (1) al congresso di medicina interna, dissi che nell'azione battericida del siero di sangue del coniglio aveva una gran parte l' alcalinità del medesimo. Nel corso di quest'anno ho proseguite le mie ricerche allo scopo di determinare:

1. Fino a quale grado di diluizione il carbonato sodico puro disciolto in acqua distillata continua ad avere azione battericida per il bacillo dal carbonchio.

2. Quale è l' equivalente dell' alcalinità del siero di sangue del coniglio corrispondente al carbonato sodico per mettervi in rapporto l' azione battericida; e se inoltre tale equivalente decresce col riscaldamento del siero, istituendo in questo caso delle ricerche intorno al meccanismo dell' azione battericida del medesimo.

3. Quale azione contro il bacillo del carbonchio ha il brodo peptonizzato contenente piccole dosi determinate di carbonato sodico puro.

## 1.

In un esperimento riportato nell' anzidetta comunicazione (1891) io vidi che il carbonato sodico alla dose di gr. 0,25 in 100 c. c. d'acqua distillata aveva il potere di sterilizzare un gran numero di bacilli del carbonchio.

Ho continuato la ricerca quest' anno con dosi molto più deboli di carbonato sodico secco puro. Adoperando nella sterilizzazione alla temperatura di 37° sempre il bacillo del carbonchio della massima virulenza (siero di sangue di cavia o di coniglio morto d' infezione carbonchiosa) io ho trovato che soluzioni di carbonato sodico 1: 3000 sterilizzano in poche ore nnmerosi bacilli carbonchiosi.

Il siero di sangue del cuore dell' animale morto di carbonchio era preso con pipetta capillare graduata al millesimo di c. c. nella quantità di c. c. 0, 02 a c. c. 0, 1; tale quantità si trasportava in 10 c. c. della soluzione (2) contenuto in pesa filtro sterilizzato. Fatto il miscuglio, questo veniva agitato ogni volta che con altre pipette sterilizzate se ne trasportava una certa quantità (c. c. 0, 02 a c. c. 0,1) nella gelatina

(1) Pane. Sull'azione battericida del sangue (Lavori del congresso di medicina interna, 1892).

(2) Siccome la soluzione di carbonato sodico anche concentrata non uccide le spore, che occorrono nell'aria, io per uccidere questi germi, trovantisi nelle soluzioni, che adoperavo, sottoponeva le medesime, distribuite in provette, venti minuti alla temperaturatura del vapor d'acqua bollente.

## TABELLA I.

| Titolo della soluzione di carbonato sodico adoperato | Quantità di siero di sangue carbonchioso trasportato in 10 c. c. della soluzione sterilizzante qui accanto | Numero dei bacilli carbonchiosi contenuti nella quantità di siero di sangue indicato qui accanto | Quantità della soluzione sterilizzante il virus carbonchioso trasportato nella gelatina | Numero delle colonie di bacilli del carbonchio sviluppatesi nella gelatina dalla soluzione sterilizzante dopo avere agitato sul virus alla temperatura di 36°—37° i tempi seguenti : | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Circa un minuto | 15 minuti | un' ora | due ore |
| 1 : 700 | c. c. 0,02 | 456,400 | c. c. 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 1000 | » 0,02 | 64,000 | » 0,02 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 1000 | » 0,02 | 112,000 | » 0,02 | 86 | 5 | 0 | 0 |
| 1 : 1500 | » 0,02 | 63,500 | » 0,02 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 1500 | » 0,02 | 39,000 | » 0,02 | 24 | 2 | 0 | 0 |
| 1 : 2000 | » 0,02 | 33,000 | » 0,02 | 38 | 6 | 0 | 0 |
| 1 : 2000 | » 0,10 * | 65,000 | » 0,10 | 195 | 26 | 3 | 0 |
| 1 : 3000 | » 0,10 * | 65,000 | » 0,10 | 238 | 45 | 7 | 0 |
| 1 : 3000 | » 0,02 | 18,000 | » 0,02 | 43 | 12 | 0 | 0 |

**N. B.** Le due esperienze segnate con * furono fatte contemporaneamente collo stesso siero di sangue carbonchioso.

fluidificata, con la quale si facevano le colture a piastre in capsule del Petri sterilizzate. I bacilli contenuti nel siero carbonchioso adoperato venivano numerati, calcolandoli dalle colonie delle colture a piastre fatte con miscuglio di contrallo (siero di sangue carbonchioso e acq. distillata e ster.).

Nella precedente tabella sono riuniti i diversi esperimenti. Da essi si rileva che soluzioni anche debolissime di carbonato sodico: ad es. 1: 3000 posseggono proprietà sterilizzanti discrete, e da paragonarsi in ogni caso alla proprietà sterilizzante la più energica del siero di sangue del coniglio.

## II.

Per poter trarre una conclusione dall'azione battericida di soluzioni debolissime di carbonato sodico in rapporto all' alcalinità del siero di sangue era necessario di intraprendere una serie di determinazioni volumetriche di tale alcalinità del siero, dovuta, come è noto, al carbonato sodico negli erbivori.

Il primo, che io sappia, il quale si occupò di determinare volumetricamente l'alcalinità del sangue fu Zuntz (1), seguito poi da Lassar (2), che migliorò il metodo di Zuntz. Secondo il metodo di questi autori 100 c. c. di sangue del coniglio appena estratto mostrarono un alcalescenza corrispondente a 150 milligrammi di soda.

Tale forte alcalescenza (nei carnivori — Lassar — e nell' uomo — Iaksch — sarebbe anche molto più forte) diminuisce presto, dopo la fuoriuscita del sangue dai vasi, per la formazione di un acido, al che forse sono compartecipi i corpuscoli rossi per la scomposizione del pigmento. Elevandosi la temperatura del sangue si facilita la formazione dell'acido.

Per determinare adunque l' equivalente di alcalinità del siero di sangue del coniglio corrispondente al carbonato sodico secco, puro, io ho proceduto nel seguente modo: Preparato il siero col metodo esposto in altro mio lavoro (3), ne poneva in un peso filtro 5 c. c. od anche più, secondo i casi, e poi vi lasciavo cadere goccia a goccia da una buretta di piccolo diametro, graduata al decimo di c. c. una certa quantità di soluzione allungata d'acido solforico, di cui, un poco primo, era stata notata la quantità necessaria per neutralizzare 10 c. c. di soluzione titolata di carbonato sodico secco, puro; quando la reazione del siero mostravasi affatto neutra, notavo la quantità della soluzione acida adoperata. Con un semplice calcolo si trovava poi l'alcalescenza di 100 c. c. di siero corrispondente al carbonato sodico. Debbo inoltre aggiungere che tale determinazione si faceva in siero avente la temperatura non maggiore di 16° e appartenente a coniglio svenato da non oltre 15 ore. Il pesafiltro contenente il siero veniva agitato a misura che le goccie di soluzione acida vi cadevano, e ripetutamente si trasportavano frazioni di goccia di siero su cartoline di tintura di tornasole sensibilissime per colpire il punto esatto in cui la reazione del siero diveniva neutra.

---

(1) Zuntz. Centralblatt f, m; Wissenschaften, 1867, n. 51.

(2) Lasser. Archiv f. d. gesammte Physiol., B. IX, S. 44.

(3) L. c. In riassunto tale metodo consiste nello svenare il coniglio coll'escissione dalla carotide, raccogliendo il sangue asetticamente in cilindro di vetro sterilizzato, dal quale poi, fissato in posizione obliqua solidamente sugli orli di un recipiente di vetro, in cui scorre a permanenza una corrente d'acqua del Serino avente la temperatura di 13°—14°, dopo 12 ore circa si decanta con precauzione il siero in provette graduate sterilizzate.

Riunisco nel seguente specchietto le diverse determinazioni fatte:

| Numero dei conigli | Peso dei conigli | Quantità di carbonato sodico secco, puro corrispondente all' alcalescenza di 100 c. c. di siero di sangue dei conigli qui accanto |
|---|---|---|
| 1 (Coniglio *a*) | gr. 1785 | gr. 0,142 |
| 1 ( » *b*) | » 1820 | » 0,180 |
| 1 ( » *c*) | » 1905 | » 0,153 |
| 1 ( » *d*) | » 1218 | » 0,094 |
| 3 ( » *e*) | » 1015<br>» 980<br>» 936 | » 0,087 |

Da uno sguardo a queste cifre si rileva che l'*alcalescenza dei conigli giovani* (gr. 1218; 1015 . . .) *è molto minore di quella dei conigli adulti e robusti*. È probabile che la differenza riscontrata in questi ultimi dipende anche dall'età dei medesimi.

La quantità di carbonato sodico corrispondente all'alcalescenza del siero, come si vede, è più che sufficiente per spiegare l'azione battericida di questo; ma, come già notai nel mio lavoro sopracitato, l'osservazione di Buchner, che il siero di sangue perde la sua azione battericida dopo un riscaldamento di mezz'ora a 55°, s' oppone a tale deduzione. Io a questo proposito riportai due mie osservazione, dalle quali risultava che anche dopo mezz' ora di riscaldamento a 55° il siero di sangue del coniglio aveva conservato quasi totalmente il suo potere battericida, e ne dedussi, pur ritenendo esatto l'anzidetta osservazione, che si potevano ottenere risultati diversi; ma la ragione che ne addussi era una semplice supposizione. Occorreva quindi di fare ulteriori ricerche con altro indirizzo.

Ecco il modo come ho proceduto: Determinato l' equivalente di alcalinità nel siero fresco col processo sopra esposto, ho riscaldato una eguale quantità di siero per 35 minuti a 55°—55°,5, e subito dopo, raffreddatolo sotto una corrente d'acqua fredda, ne ho determinato l'equivalente di alcalinità allo stesso modo. Riunisco nel seguente specchietto le diverse determinazioni fatte.

Il siero di sangue adoperato fu lo stesso di quello dei conigli riportati nello specchietto precedente.

| Quantità di carbonato sodico corrispondente all'alcalinità di 100 c. c. di siero di sangue di coniglio (conigli *a, b, c, d, e,* dello specchietto precedente ) | | Idem come accanto ma il siero ha subito un riscaldamento a 55°, 55°,5 per 35 minuii |
|---|---|---|
| Coniglio *a*) | gr. 0,142 | gr. 0,089 |
| » *b*) | » 0,180 | » 0,100 |
| » *c*) | » 0,153 | » 0,091 |
| » *d*) | » 0,094 | » 0,062 |
| » *e*) | » 0,087 | » 0,058 |

Come si vede, la quantità di carbonato sodico corrispondente all' alcalinità del siero, dlminuisce col riscaldamento di questo.

Eccetto per il siero di sangue del coniglio — *a*) che non fu adoperato per saggiarne l'azione battericida contro il bacillo del carbonchio, negli altri casi (*b, c, d, e*) se ne fece la prova col siero di sangue fresco e dopo il riscaldamento.

Il siero limpido ritratto dal sangue di ciascun coniglio in sufficiente quantità (20 a 30 c. c. nei conigli grandi) veniva distribuito, dalle provette graduate sterilizzate, entro cui era stato decantato, in 4 o 5 pesafiltri sterilizzati, procedendo in modo che ciascun pesafiltro ne ricevesse una quantità non minore di 5 c. c. In questa maniera mi era agevole di eseguire la prova di disinfezione comparative colla massima precisione e sollecitudine. Il bacillo del carbonchio adoperato anche qui, come nella sterilizzazione con soluzioni di carbonato sodico, fu preso dal siero di sangue del cuore di conigli o di cavie morti per infezione carbonchiosa.

Riunisca nella seguente tabella le diverse esperienze fatte. In ciascuna di essa la quantità di siero adoperata fu 5—6 c. c., e vi si mescolava il siero carbonchioso nella quantità di c. c. 0,005—0,010. La quantità di questi miscugli trasportata nella gelatina liquefatta per fare le colture a piastra in capsule del Petri fu per ciascuna coltura c. c. 0,02—0,1.

Dando uno sguardo alla tabella si rileva che mentre nel coniglio *b*) il siero conserva sufficiente potere battericida anche dopo il riscaldamento, nei conigli giovani rappresentati da *d*) ed *e*) l'azione battericida del siero, già debole prima, è completamente scomparse dopo il riscaldamento. Tutto ciò, è in stretto rapporto col diverso grado di alcalinità del siero fresco e di quello riscaldato.

Ma la dimostrazione diretta che *all' alcalinità del siero è dovuta esclusivamente l'azione battericida contro il bacillo del carbonchio* è data dal seguente esperimento, che del resto non è altro che un perfezionamente di esperienze analoghe riportate nella mia comunicazione sopra menzionata: Con soluzione allungata d' acido solforico (1:200) si riempiono i quattro quinti del lume di una buretta, avente piccola diametro, graduata al decimo di c. c.; se ne chiude l' apertura superiore con ovatta, e si pone con tutto il piede di sostegno nella stufa ad ac-

# TABELLA II.

| Provenienza del siero | Numero delle colonie di bac. carb. sviluppatesi dal siero fresco dopo avere agito sul virus alla temperatura di 36°–37° i tempi seguenti: | | | Idem ma dal siero previamente riscaldato per 35 minuti a 55°–55°,5 | | | Annotazioni |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | circa 1 minuto | 2 ore | 7 ore | circa 1 minuto | 2 ore | 7 ore | |
| Coniglio *b*) | 126 | 11 | 0 | 195 | 72 | 18 | Dopo 36 ore nel siero riscaldato comincia ad apparire coltura di b. carb. |
| Coniglio *c*) | 270 | 18 | 0 | 530 | 362 | Innumerevoli | |
| Coniglio *d*) | 214 | 110 | 1170 | 385 | circa 2400 | — | Dopo 7 ore nel siero riscaldato si osserva coltura di bac. carb. |
| Coniglio *e*) | 390 | 242 | ∞ | 670 | ∞ | — | Dopo 7 ore nel siero riscaldato si osserva cultura rigogliosa di bac. carb. Nel siero non riscaldato la coltura è appena appariscente. |

qua. Si fa poi bollire l'acqua, e nel vapore si lascia sterilizzare la buretta per 20 minuti. Si ritira con precauzione la buretta dalla stufa e dopochè la soluzione d'acido solforico si è raffreddata, se ne determinano la quantità necessaria per neutralizzare 10 c. c. di soluzione titolata di carbonato sodico; quindi si neutralizzano accuratamente 5 c. c. di siero di sangue di un coniglio forte di gr. 1842 (l'alcalinità di 100 c.c. di siero di questo coniglio corrispose a gr. 0,172 di carbonato sodico). Determinata la quantità di soluzione acida necessaria per neutralizzare i 5 c. c. di siero anzidetto io aggiunsi la stessa quantità, colla massima cautela per conservare l'asepsi, ad altri 5 c. c. di siero identico contenuti in pesafiltro sterilizzato. Nello stesso modo procedetti per neutralizzare l'equale quantità di siero contenuto in un terzo pesafiltro.

Eseguita tale operazione feci colla massima sollecitudine la prova di stirilizzazione comparativa del bacillo del carbonchio col siero neutralizzato e col siero normale procedendo allo stesso modo come nelle esperienze riportate nella tabella precedente (Tabella II). Il risultato si rileva nel seguente specchietto:

*Siero normale*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Dopo circa | 1 minuto, | colonie | 126 |
| Dopo | 2 ore | » | 11 |
| Dopo | 7 ore | » | 0 |

*Siero neutralizzato*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Dopo circa | 1 minuto, | colonie | 370 |
| Dopo | 2 ore | » | 1480 |

Dopo 7 ore non si fa il trasporto dal siero neutralizzato in gelatina, perchè vi si è già sviluppata coltura caratteristica di bacilli del carbonchio. Nei preparati microscopici fatti da tale coltura si riscontrano molti bacilli del carbonchio nodosi in mezzo ad altri in cui i nodi sono appena accennati.

L'altro siero neutralizzato, nel modo or ora indicato, contenuto nel terzo pesafiltro fu adoperato per provarne l'azione sul bacillo dal tifo. Vi trasportai un piccola ansa di filo di platino di coltura in brodo di 20 ore di vita, sviluppata a 36°-37°. L'esito fu affatto opposto a quello ottenuto col bacillo del carbonchio, cioè l'azione battericida del siero neutralizzato si dimostrò in modo evidentissimo contro il bacillo del tifo.

Dopo un tale risultato io era inclinato a ritenere che l'azione battericida del siero di sangue contro il bacillo del tifo non fosse dovuta all'alcalinità del siero; in altre parole non fosse un *processo chimico*; o per lo meno, nell'attuale stato delle nostre conoscenze, non fosse ancora determinabile, e quindi nel caso speciale era da accettare l'opinione del Buchner, che riteneva tale azione battericida esser dovuta agli albuminoidi del siero di sangue. Ma un lavoro recentissimo di Emmerich; Tsuboi, Steinmetz e Löw (1) mi fece bentosto ricredere. Questi osservatori con una serie di ricerche dimostrano che l'azione battericida del siero di sangue contro il bacillo del tifo è un *processo chimico*, e all'osservazione fatta la prima volta da Buchner, cioè che il siero di sangue

(1) Centralblatt f. Bakteriologie u. Par. 1892. B. XII, n. 11, 12, 13 e 14.

neutralizzato continua ad esercitare la sua azione batterecida sul bacillo del tifo, gli A. A. contrappongono un loro esperimento, dove essi aggiungendo al siero di sangue del coniglio, dopo averlo neutralizzato, un po' d'acido videro che tale azione cessava affatto.

## III.

Il bacillo del carbonchio, come si rileva dalle precedenti ricerche, è un batterio molto sensibile all'azione del carbonato sodico. Questa sostanza anche nel brodo agisce contro il medesimo in piccola dose. Nel brodo peptonizzato nettamente alcalino, contenente gr. 0, 1 °/₀ di carbonato sodico, che spesso si adopera per le colture dei batteri, senza attribuirgli punto proprietà battericida, io ho sempre costatato in breve tempo una diminuzione del numero dei bacilli carbonchiosi trapiantativi. Questo fatto mi ricorda le osservazioni di Christmas (1), il quale procurò di dimostrare che i bacilli del carbonchio trasportati da un mezzo di coltura in un altro (nel caso di Ch. dal siero di sangue nel brodo) subiscono nel nuovo terreno di coltura una diminuzione del loro numero. È probabile che Christmas adoperò un brodo leggiermente, o nettamente, alcalino, perchè nel brodo di ottima qualità e di reazione affatto neutra io non ho mai veduto una diminuzione del numero dei bacilli trapiantativi dalla coltura in siero di sangue.

Quando la quantità di carbonato sodico nel brodo peptonizzato raggiunge gr. 0,35—0,4 %, allora i bacilli del carbonchio anche trasportativi in gran quantità (ad es. 1 ansa di coltura in gelatina o di sangue carbonchioso) non solo non vi si moltiplicano, ma in poche ore vi restano sterilizzati, se si è avuto cura di adoperare bacilli affatto privi di spore. Come avviene con altre sostanze battericide (2) anche pel carbonato sodico si può ottenere con soluzioni in brodo più deboli la sterilizzazione completa dei bacilli carbonchiosi, diminuendo il loro numero. Ad es. nel brodo contenente carbonato sodico nella proporzione di 1:450 si nota non sola discreto potere sterilizzante, quando s'adopera il metodo per dimostrare l'azione battericida del siero, ma anche si può riuscire a dimostrare, che esso rimane sterile dopo di avervi trapiantato un certo numero di bacilli. Io son riuscito a introdurre con precisione matematica in diversi tubi, contenenti ciascuno 10 c. c. di tal brodo, 40 a 180 bacilli del carbonchio virulentissimi, presi dal siero di sangue del cuore di coniglio morto d'infezione carbonchiosa, e tuttavia non ebbe luogo alcuno sviluppo, mentre nei tubi di controllo contenenti lo stesso brodo, ma di reazione neutra si formarono colture rigogliose dopo 24 ore, alla temperatura di 36°—37°.

Se ora si mette in rapporto l'alcalinità del brodo anzidetto con quella che ha il sangue circolanta del coniglio, la quale come sopra si è veduto nella determinazione fatta col metodo di Zuntz-Lassar, è anche più forte, si può spiegare facilmente, perchè il coniglio adulto possiede una relativa immunità, o meglio una discreta resistenza, verso l'infezione carbonchiosa (3).

---

(1) Christmas. Annales de l'Institut Pasteur 1891, n. 8. L'A. pretese spiegare con la teoria dell'adattamente l'azione battericida del sangue!

(2) Pane. Sulle condizione che modificano il potere antisettico di alcune sostanze. (Atti della R. Accademia medica di Roma, 1890).

(3) Lubarsch. Contralblatt f. Bak. B. VI, 1889. — Pane. Lavori del congresso di medicina interna 1891.